

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Иванова Романа Александровича «Коллоидно-химические свойства смесей лизоцим - ПАВ в системе водный раствор/октан», представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 02.00.11 – коллоидная химия

История научных исследований взаимодействий белков и поверхностно-активных веществ насчитывает уже более столетия, с того момента, как в 1897 году дифильные соединения были впервые использованы как антитоксины для связывания токсинов змеиного яда и столбнячной палочки. Сегодня диапазон практических приложений этих исследований простирается от определения молекулярного веса белков до создания эффективных моющих средств, лекарственных препаратов и средств личной гигиены. Фундаментальная ценность изучения таких взаимодействий по-прежнему очень велика, в частности, для некоторых разделов биохимии достижения последних лет в этой области позволили существенно расширить как методические возможности, так и научные представления о строении и функционировании клеточной мембраны. Прежде всего, это касается биохимии трансмембранных белков, изучение которых представляло собой чрезвычайно трудную задачу до тех пор, пока не были разработаны основы солюбилизации мембран и кристаллизации таких белков с помощью ПАВ. Изучение взаимодействий глобулярных белков и поверхностно-активных веществ также является важной проблемой, в том числе, и с точки зрения выявления закономерностей поведения и строения, общих для трансмембранных и глобулярных белков, позволяющих ответить на некоторые вопросы о химической эволюции этих соединений.

В этой связи большое развитие получили исследования таких взаимодействий на межфазных границах, в том числе, покрытых адсорбционными слоями ПАВ, позволяющих моделировать как поверхности в коллоидных системах, так и поверхность клеточной мембраны. Подавляющее большинство работ в этом направлении касается систем, иммобилизованных на границе раздела воздух/вода, в то время, как экспериментальные возможности для более точного и технически сложного анализа взаимодействий белков и ПАВ на границе несмешивающихся органической и водной фаз остаются ограниченными. Многие важные вопросы в этой области до сих пор не решены в полном объеме, в частности, такие, как отличия механизма денатурации белков с помощью ПАВ от денатурации классическими хаотропными агентами (например, мочевиной), роль мицеллообразования в этих взаимодействиях, причины различия эффектов ионогенных и неионогенных ПАВ, влияние природы растворителя на эти взаимодействия и другие.

Поэтому экспериментальное исследование коллоидно-химических свойств смесей лизоцим-ПАВ в двухфазных системах водный раствор/органическая жидкость является исключительно актуальной

проблемой, а сочетание сцинтилляционного метода исследования адсорбционных слоев с межфазной тензиометрией в значительной мере обуславливает новизну такого исследования

Диссертационная работа Иванова Р. А. изложена на 135 страницах печатного текста и состоит из введения и трех глав: литературного обзора, главы, в которой изложены экспериментальные методики, главы, посвященной основным результатам и их обсуждению, а также основных выводов. В диссертацию включен список использованных в работе сокращений и обозначений. Список цитируемой литературы насчитывает 217 наименований. Работа включает 54 рисунков и 6 таблиц.

Литературный обзор (**Глава 1**) начинается с весьма важного и полезного раздела, в котором сопоставлены типы взаимодействий глобулярных белков и ПАВ различной природы. Отмечено многообразие возможных механизмов этих взаимодействий и сложный характер влияния связывания ПАВ с поверхностью белка на его ферментативную активность. Далее обсуждаются известные данные по поверхностному натяжению и адсорбции преимущественно водных смесей ПАВ-белок. Подчеркивается ограниченность сведений об адсорбции таких смесей в двухфазных системах жидкость/жидкость. Особое место занимает важный раздел с подробным описанием сцинтилляционного метода и примерами его использования для изучения адсорбционных слоев ПАВ-белок, позволяющими полностью обосновать выбор этого метода в качестве одного из основных для выполнения диссертационной работы. Также кратко приводятся данные о стабилизации эмульсий с помощью смесей белок-ПАВ различного состава. Литературный обзор завершается вполне обоснованной постановкой задач исследования.

Вторая глава посвящена описанию использованных в работе материалов и экспериментальных методов исследований. В качестве основных объектов исследования были выбраны лизоцим белка куриных яиц, классические ионогенные ПАВ: додецилтриметиламмоний бромид и додецилсульфат натрия, и цвиттер-ионное ПАВ - кокоамидопропил бетаин. Выбор каждого соединения обоснован с позиций задач работы. Приведены характеристики и других компонентов смешанных систем, подробно описаны методики приготовления смешанных растворов и буферных смесей.

Исключительно тщательно и подробно описаны методы исследования, которые были использованы в работе: методом сцинтиллирующей фазы с использованием тритиевой метки, метод висящей капли для измерения поверхностного натяжения в смешанных системах, метод динамического светорассеяния, спектрометрия, измерение электрохимического потенциала и электрофоретической подвижности, исследование избирательного смачивания и ферментативной активности лизоцима в присутствии ПАВ. Важной методической частью работы стал синтез меченого неионогенного ПАВ (САРВ), который был проведен впервые.

Материал этой главы, относящийся к описанию объектов и методов измерения характеристик смешанных двухфазных систем, является базовым

для понимания и оценки всей диссертации. Этот раздел работы написан четко, содержит необходимые формулы и иллюстрации и готовит читателя к анализу основных результатов работы, излагаемых в следующих главах.

Третья глава разбита на несколько разделов. В **первом разделе** обсуждается взаимное влияние ПАВ и лизоцима на распределение в системе вода-октан методом сцинтиллирующей фазы и проведено их обсуждение. Автором получен целый ряд интересных результатов.

Рассмотрены результаты исследования смесей ПАВ-белок для двух концентраций белка (0.01. и 0.1 г/л) при различных концентрациях ПАВ в диапазоне значений 10^{-7} - 10^{-2} М. Определены коэффициенты распределения как в индивидуальных, так и в смешанных системах. Показано, что величина коэффициента распределения лизоцима в бинарных системах с классическими ПАВ возрастает относительно индивидуального раствора в области низких концентраций ПАВ и снижается при в области высоких концентраций, при этом пороговое значение зависит от содержания белка в системе. Автор объясняет этот эффект формированием гидрофобных комплексов белок – ПАВ, обладающих большей растворимостью в органической фазе, чем чистый лизоцим. Присутствие лизоцима, в свою очередь, влияет на коэффициенты распределения ионогенных ПАВ в сторону увеличения.

Интересно, что наличие в системе цвиттер-ионного CAPB практически не влияет на поведение белка, независимо от его концентрации и концентрации ПАВ, в то же время, в присутствии белка изменяется распределение самого ПАВ.

Второй раздел касается изучения адсорбции ПАВ и белка на межфазной границе в исследованных двухфазных системах. Решение этой задачи проводилось в два этапа, первый состоял в исследовании систем с меченым белком, на втором этапе были изучены системы, в которых тритиевая метка была введена в структуру ПАВ. Данные, полученные с использованием обоих подходов, в целом совпадают. Показано, что при малом содержании белка в системе и в области малых концентраций ионогенных ПАВ адсорбция лизоцима значительно возрастает за счет формирования гидрофобного комплекса, а при дальнейшем увеличении концентрации ПАВ начинает закономерно снижаться вследствие конкурентной адсорбции, а также гидрофилизации комплекса, при этом для системы на основе SDS выявлен синергетический эффект при адсорбции обоих соединений.

На основе полученных результатов с привлечением данных по измерению электрохимической подвижности и электрокинетического потенциала белка в бинарных системах автором была предложена модель образования гидрофобного комплекса ПАВ-белок для обоих ионогенных ПАВ с учетом строения двойного электрического слоя при экспериментальных значениях рН и концентрации электролита в фосфатном буфере.

Кроме того, установлено, что эффект CAPB существенно отличается от влияния SDS и DTAB. CAPB не способен вытеснять лизоцим из адсорбционного слоя, что автор объясняет сильными взаимодействиями между полярными группами ПАВ и поверхностью белка с образованием гидрофобного комплекса.

Третий раздел посвящен обсуждению результатов измерений поверхностного и межфазного натяжения как водных растворов, так и двухфазных систем методом висящей капли. Полученные зависимости соответствуют переходу от адсорбционных слоев белка к адсорбционным слоям ПАВ при увеличении концентрации последних. С помощью этого метода также был подтвержден синергетический эффект адсорбции SDS и лизоцима за счет образования гидрофобного комплекса. Проведено сравнение величин адсорбции, полученных методом измерения межфазного натяжения и сцинтилляционным методом, и показано их близкое совпадение для SDS и DTAB.

Четвертый раздел касается определения констант взаимодействия белок-ПАВ в адсорбционных слоях в рамках модели Файнермана, рассматривающей одновременное присутствие в слое как ПАВ, так и его комплекса с белком. Расчет проводился для систем на основе SDS и DTAB. Согласно полученным данным, в смешанных адсорбционных слоях такого состава имеет место притяжение между компонентами за счет преобладания дисперсионных взаимодействий по отношению к электростатическим при данной концентрации электролита.

В пятом разделе изложены данные измерений размеров частиц, образующихся в смешанных системах белок-ПАВ. Показано, что размер частиц практически не изменяется при добавлении DTAB, а также при добавлении SDS к раствору белка с концентрацией 0.1 г/л и соответствует гидродинамическому диаметру белковой глобулы, равному 3.5 нм. В системах на основе смесей лизоцим – CAPB при концентрациях ПАВ выше 10^{-4} М формируются крупные агрегаты, что автор связывает с денатурацией белка вследствие разрушения сетки водородных связей при взаимодействии с цвиттер-ионной группой CAPB. В этом же разделе приводятся результаты измерения спектров поглощения для всех исследованных систем, полученные данные согласуются с данными, полученными методом динамического светорассеяния.

Шестой раздел содержит обсуждение результатов исследования двухфазных систем методом флуоресцентной спектроскопии. Все исследованные системы имеют максимум эмиссии при длине волны 342 нм, соответствующий максимуму флуоресценции лизоцима. Были получены интересные зависимости интенсивности флуоресценции от природы добавленного ПАВ и его концентрации. Так, для SDS и DTAB наблюдается рост интенсивности, в то время, как в присутствии CAPB имеет место тушение флуоресценции, отвечающее той же концентрации, при которой методом динамического светорассеяния фиксируется начало образования крупных агрегатов в такой системе. Эти эффекты автор объясняет

соответствующем изменении полярности микроокружения триптофановых фрагментов лизоцима.

Седьмой раздел содержит сведения об исследовании зависимости ферментативной активности лизоцима в отношении к клеткам *Micrococcus luteus* по изменению оптической плотности клеточной суспензии в присутствии изученных ПАВ. Важным достижением данной работы стала демонстрация увеличения активности в области малых концентраций SDS и DTAB и сохранение ее на уровне, типичной для индивидуального белка, при высоких концентрациях ($> 10^{-5}$ М). Автор относит обнаруженный рост активности на счет снижения электростатических взаимодействий между клеткой и ферментом при образовании гидрофобных комплексов ПАВ-белок. Присутствие цвиттер-ионного ПАВ приводит к менее выраженному эффекту в области малых концентраций, а при достижении концентрации 10^{-5} М, отвечающей агрегации в объеме раствора, активность фермента значительно снижается.

Для объяснения зависимости активности лизоцима от концентрации ионогенных ПАВ автор предложил модель, предполагающую наличие на поверхности белковой глобулы два различных типа участков. Каждый из них характеризуется своей константой десорбции и типом взаимодействий с молекулами ПАВ (гидрофобным и гидрофильным). Модель основана на допущении о линейной зависимости активности белка от степени заполнения участков, которые взаимодействуют с ПАВ независимо. Модель была аппроксимирована методом наименьших квадратов для описания зависимости активности лизоцима от концентрации DTAB и SDS.

В восьмом разделе изложены результаты измерений избирательного смачивания в системах ПАВ-лизоцим. Показано, что стабильность смачивающих пленок пропорциональна концентрации ПАВ и практически не зависит от концентрации лизоцима. Наибольшей устойчивостью в системе вода-октан обладают пленки, формирующиеся в присутствии CAPB. При анализе полученных данных было выявлено расхождение экспериментальных результатов с рассчитанными по модели вязкого растекания. Автор считает, что это расхождение объясняется протеканием избирательного смачивания в таких системах в режиме граничной кинетики.

Заключительный **девятый раздел** посвящен интерпретации полученных данных в рамках механизма постепенного формирования адсорбционных слоев из лизоцима и соответствующих ПАВ на межфазной границе в системе вода/октан при увеличении концентрации ПАВ. Рассматривается последовательное формирование смешанных слоев белка и ПАВ с образованием гидрофобных комплексов, которые гидрофилизуются по мере увеличения содержания ПАВ и переходят в объем водного раствора с одновременным образованием мицеллярной фазы. Автор отмечает сходство механизмов адсорбции в бинарных системах на основе DTAB и SDS с учетом более высокой гидрофобности комплекса лизоцима и SDS. Для смеси лизоцим-CAPB предполагается образование гидрофобного комплекса,

постепенно переходящего в органическую фазу, денатурация белка при высоких концентрациях ПАВ и образование крупных белковых агрегатов.

Практическая значимость проделанной работы логически вытекает из ее результатов: полученные данные могут быть использованы при составлении двухфазных лекарственных или косметических композиций на основе лизоцима и изученных ПАВ, в особенности это касается SDS и CAPB. Важное значение для практики имеют и выявленные автором эффекты влияния концентрации ПАВ на ферментативную активность белка и устойчивость смачивающих пленок в присутствии белка.

Замечания по материалу диссертационной работы сводятся к следующему.

Глава 1:

1) В литературном обзоре автор никак не разграничивает и не сопоставляет типы белков (трансмембранные и глобулярные), с которыми взаимодействуют ПАВ, более того, о достижениях в области исследований взаимодействий трансмембранных белков и ПАВ фактически не упоминается. Несмотря на то, что в работе основным объектом исследования выступает глобулярный белок и такой акцент при рассмотрении литературы вполне понятен, включение краткой информационной справки по основным результатам, полученным для трансмембранных белков, и краткий сравнительный анализ этих данных могли бы способствовать более ясному обоснованию как цели диссертации, так и ее значимости.

2) В литобзоре также не содержится данных о механизме бактерицидного действия лизоцима, хотя и обсуждается влияние ПАВ на эту характеристику, и часть диссертационной работы также посвящена изучению взаимосвязи ферментативной активности и образования комплексов ПАВ-лизоцим.

3) Выбор латинской раскладки для списка использованных сокращений представляется необоснованным. Большинство из них могло бы быть заменено кириллицей.

4) Встречаются множественные стилистические погрешности вида «найдено, что», «получено, что».

5) Кроме того, литературный обзор недостаточно хорошо структурирован. Вместо выдвижения определенных положений, которые находили бы свое подтверждение в литературных данных, автор выбрал перечисление опубликованных работ с описанием основных результатов и выводов (в наибольшей степени это характерно для первой и второй части обзора).

Глава 3

Раздел 1

Данные по распределению ПАВ и белка в двухфазных системах приводятся в виде полулогарифмических зависимостей коэффициента

распределения от концентрации для лизоцима и CAPB (рис. 14, 16 и 17) и в виде концентрационных логарифмических зависимостей – для SDS и DTAB (рис. 15), что затрудняет их прямое сравнение. Причина отсутствия единообразия в представлении сходных экспериментальных данных не поясняется.

Раздел 2

Согласно авторской интерпретации отсутствие выраженного влияния цвиттер-ионного ПАВ на формирование адсорбционных слоев лизоцима объясняется образованием прочного гидрофобного комплекса состава 100 к 1 лизоцим-CAPB. Неясно, почему при этом коэффициент распределения лизоцима в присутствии CAPB практически не изменяется, и почему такая смесь не образует осадка подобно смеси с SDS.

Раздел 3 с. 81, рис. 32 – часть рисунка потеряна

Раздел 4 и раздел 5

- 1) имеют одинаковую нумерацию
- 2) не упоминается, какие именно растворы измерялись, двухфазные или однофазные (органические или водные).

Раздел 5

О механизме ферментативного действия лизоцима вскользь упоминается при обсуждении результатов на стр. 90, где утверждается, что «ферментативное действие лизоцима основано на разрушении амидных групп мурамилглюкозамина», что неверно – лизоцим разрушает гликозидную связь между ацетилмурамовой кислотой и ацетилмурамилом.

Раздел 6

а) Предложенная модель влияния ПАВ на ферментативную активность белка слишком упрощена и противоречит высказанному автором утверждению о том, что диссоциация полярных групп ПАВ в значительной степени подавлена в солевом растворе. Более того, автор сам утверждает на стр. 88, что дисперсионные взаимодействия в этих условиях преобладают над электростатическими. Это означает, что взаимодействия полярных групп с поверхностью белка конкурируют с дисперсионными. В то же время, предложенная модель описывает связывание ПАВ с белком как первичное связывание за счет полярных групп, гидрофобные взаимодействия, согласно модели, начинают отвечать за формирование гидрофильного комплекса только после того, как все гидрофильные участки оказываются заполнены. Таким образом, положение о последовательном независимом связывании, на котором основана модель, в данном случае неприменимо, а сама модель должна быть соответствующим образом скорректирована.

б) Рассмотрение влияния связывания белка с ПАВ на ферментативную активность исключительно в терминах гидрофобизации-гидрофилизации поверхности белка малопродуктивно без учета таких явлений, как кооперативный эффект (аллостерия). Положения модели о том, что константы связывания на участке поверхности не меняются при связывании ПАВ, а активность белка линейно зависит от концентрации ПАВ, выглядят малообоснованными.

На необходимость рассмотрения изменения ферментативной активности при активации-блокировании рецепторных центров на поверхности белка прямо указывают и данные флуоресцентного анализа, полученные автором. Изменение полярности окружения определенных групп может прямо влиять на протекание реакции расщепления гликозидной связи, подвергающейся сильной поляризации в «кармане» -рецепторе лизоцима.

Раздел 9

Этот раздел диссертации выглядит наименее удачным и вызывает ряд вопросов к схематическим изображениям предложенных моделей адсорбции.

1) Для всех трех моделей молекула лизоцима обращена наиболее гидрофильным участком в гидрофобную фазу, что не обосновано с точки зрения термодинамики;

2) При образовании гидрофильного комплекса полярные группы ПАВ так же обращены в гидрофильную фазу, что, во-первых, энергетически невыгодно, во-вторых, сомнительно с точки зрения механизма образования такого комплекса. Предложенная схема подразумевает связывание ПАВ напрямую из неводной фазы, в то время, как более вероятным является связывание ближайших молекул ПАВ из монослоя с «проворотом» комплекса в водную фазу.

3) Наконец, для системы лизоцим-САРВ утверждается, что гидрофобный комплекс переходит в органическую фазу. Это утверждение не согласуется с тем, что D лизоцима не изменяется в присутствии САРВ, хотя аналогичный переход в случае SDS и DTAB приводит к увеличению не только коэффициента распределения ПАВ, но и белка.

В связи с этим предложенные схемы нуждаются в доработке при дальнейших исследованиях по этой тематике.

Высказанные замечания носят рекомендательный характер и не затрагивают основной сути диссертационной работы.

Диссертация Иванова Р. А. является законченной научно-квалификационной работой. Основные научные положения и выводы, изложенные в диссертации, оригинальны, перспективны для дальнейшего практического использования и являются результатом самостоятельной научно-исследовательской работы автора.

Автореферат и публикации, включающие 3 статьи в рекомендованных ВАК ведущих российских периодических изданиях и 1 статью в международном журнале, 1 статью в рецензируемом сборнике и 7 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях, в полной мере отражают содержание диссертации.

Диссертационное исследование соответствует паспорту специальности научных работников 02.00.11 – коллоидная химия в части 1 (Поверхностные силы, устойчивость коллоидных систем, смачивание и адсорбция) и части 2 (Теоретические основы действия поверхностно-активных веществ (ПАВ) на границах раздела фаз. Теория мицеллообразования и солюбилизации в растворах ПАВ).

Можно заключить, что диссертация Иванова Романа Александровича «Коллоидно-химические свойства смесей лизоцим - ПАВ в системе водный раствор/октан» удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, изложенным в Положении «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденном постановлением правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (пункты 9–14), а ее автор, Иванов Роман Александрович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.11 – коллоидная химия.

Доктор химических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории физической химии
супрамолекулярных систем
Института физической химии и
электрохимии им. А.Н.Фрумкина РАН

М. А. Калинина

Подпись руки М. А. Калининой
Заверяю
Ученый секретарь ИФХЭ РАН
кхн Варшавская И.Г.



Москва 119171 Ленинский проспект 31 строение 4
тел. 8 495 955 44 08
e-mail: Kalinina@phycbe.ac.ru